

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

AII

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平6-506210

第3部門第2区分

(43)公表日 平成6年(1994)7月14日

(51) Int.Cl [®]	識別記号	序内整理番号	F I
C 07 D 493/08	B	9165-4C	
A 61 K 31/35	ADD	7431-4C	
	ADN	7431-4C	
B 01 D 15/08		8014-4D	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 6 頁)

(21)出願番号 特願平4-508303	(71)出願人 メルク エンド カンパニー インコーポレーテッド アメリカ合衆国、ニュー・ジャーシイ 07065、ローウエイ、イースト・リンカーン・アヴェニュー 126
(86) (22)出願日 平成4年(1992)3月9日	(72)発明者 ヘイトコ、ピーター・エヌ アメリカ合衆国、ニュー・ジャーシイ 07065、ローウエイ、メイン・ストリート・1811
(85)翻訳文提出日 平成5年(1993)9月8日	(72)発明者 ワイルドマン、アーサー・エス、ジュニア アメリカ合衆国、ニュー・ジャーシイ 08836、マーテインスピル、ヒルクレスト・ロード・33
(86)国際出願番号 PCT/US92/01864	(74)代理人 弁理士 川口 義雄 (外2名)
(87)国際公開番号 WO92/16276	
(87)国際公開日 平成4年(1992)10月1日	
(31)優先権主張番号 668, 831	
(32)優先日 1991年3月13日	
(33)優先権主張国 米国(US)	
(31)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE), CA, JP, US	

(54)【発明の名称】 HMG-CoAレダクター七阻害物質の精製方法

(57)【要約】

分取高性能液体クロマトグラフィーを使用するHMG-CoAレダクター七阻害物質の精製方法、及び、
HMG-CoAレダクター七阻害物質と医薬として許容される担体とを含む医薬組成物。

請求の範囲

1. (1) トリオルガノシリル、シアノオルガノシリルまたはポリスチレン-ジビニルベンゼン共重合体とオルガノシリルとから成るグループから選択された固定相で任意にコートされたシリカを充填するかまたは多孔質黒鉛炭素を充填した高性能液体クロマトグラフィーカラムに粗HMG-C₆Aレダクターゼ阻害物質の溶液を導入し、
(a) アセトニトリル、メタノール、エタノール、アセトン、テトラヒドロフラン、イソプロパノール、酢酸エチル、メチレンクロリドもしくはクロロホルムから成るグループまたはその混合物から選択された有機溶媒と、
(b) 任意に、水、またはリン酸もしくは酢酸から選択された水溶液と、から成る溶媒混合物で溶出させ、
(3) 溶出したHMG-C₆Aレダクターゼ含有分画から溶媒混合物の約30～35%を除去し、
(4) HMG-C₆Aレダクターゼ阻害物質分画を含有する溶出分画を水で処理してHMG-C₆Aレダクターゼ阻害物質を晶出させる処理から成る粗HMB-C₆Aレダクターゼ阻害物質の精製方法。
2. HMG-C₆Aレダクターゼ阻害物質がロバスタチン、

し乾燥して純度99.5%の生成物を得ることを特徴とする請求項1に記載の方法。

1. (1) トリオルガノシリル、シアノオルガノシリルまたはポリスチレン-ジビニルベンゼン共重合体とオルガノシリルとから成るグループから選択された固定相で任意にコートされたシリカを充填するかまたは多孔質黒鉛炭素を充填した高性能液体クロマトグラフィーカラムに粗HMG-C₆Aレダクターゼ阻害物質の溶液を導入し、
(a) アセトニトリル、メタノール、エタノール、アセトン、テトラヒドロフラン、イソプロパノール、酢酸エチル、メチレンクロリドもしくはクロロホルムから成るグループまたはその混合物から選択された有機溶媒と、
(b) 任意に、水、またはリン酸もしくは酢酸から選択された水溶液と、から成る溶媒混合物で溶出させ、
(3) 溶出したHMG-C₆Aレダクターゼ阻害物質含有分画から溶媒混合物の約60～65%を除去してHMG-C₆Aレダクターゼ阻害物質を晶出させる処理から成る粗HMB-C₆Aレダクターゼ阻害物質の精製方法。
1. 99.5%以上の純度を有するHMG-C₆Aレダクターゼ阻害物質または医薬として許容されるその塩。

シンバスタチン、アラバスタチン、フルバスタチンまたはメバスタチンから成るグループから選択されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

3. HMG-C₆Aレダクターゼ阻害物質がロバスタチンまたはシンバスタチンから選択されることを特徴とする請求項2に記載の方法。
4. HMG-C₆Aレダクターゼ阻害物質がロバスタチンであることを特徴とする請求項3に記載の方法。
5. オクタデシルシラン固定相でコートされたシリカをカラムに充填することを特徴とする請求項3に記載の方法。
6. 溶媒混合物がアセトニトリルと水とから成ることを特徴とする請求項4に記載の方法。
7. 溶媒混合物が70%のアセトニトリルと30%の水とから成ることを特徴とする請求項6に記載の方法。
8. クロマトグラフィーの処理温度が15℃～60℃であることを特徴とする請求項7に記載の方法。
9. HMG-C₆Aレダクターゼ阻害物質を含有する溶出分画から溶媒混合物の約1/3を除去することを特徴とする請求項8に記載の方法。
10. 更に、HMG-C₆Aレダクターゼ阻害物質を済過

1.3. HMG-C₆Aレダクターゼ阻害物質が、ロバスタチン、シンバスタチン及びアラバスタチンから成るグループまたは医薬として許容されるその塩から選択されることを特徴とする請求項1.2に記載の化合物。

- 1.4. HMG-C₆Aレダクターゼ阻害物質がロバスタチンであることを特徴とする請求項1.3に記載の化合物。
- 1.5. HMG-C₆Aレダクターゼ阻害物質がシンバスタチンであることを特徴とする請求項1.3に記載の化合物。
- 1.6. HMG-C₆Aレダクターゼ阻害物質がアラバスタチンであることを特徴とする請求項1.3に記載の化合物。
- 1.7. 高性能液体クロマトグラフィーを含む方法で精製された純度99.5%以上を有するHMG-C₆Aレダクターゼ阻害物質。
- 1.8. 非毒性の治療有効量の請求項1.2に記載の化合物と医薬として許容される組体とを含む医薬組成物。
- 1.9. 非手毒性の治療有効量の請求項1.2に記載の化合物を、胃腸管に再吸収されない形態で胆汁酸と結合し得る医薬として許容される無毒カチオン性ポリマー、及び、医薬として許容される組体と共に含むことを特徴とする医薬組成物。

20. 非毒性の治療有効量の請求項1-2に記載の化合物を、

- (a) スクワレンシンセターゼ阻害物質；
- (b) HMG-C₆Aシンセターゼ阻害物質；
- (c) スクワレンエボキシダーゼ阻害物質；
- (d) アロブコール；
- (e) ナイアシン；
- (f) ジュンフィブロジル；及び
- (g) クロフィブレート

から成るグループから選択された非毒性の治療有効量のコレステロール降下剤と共に含む医薬組成物。

明細書

HMG-C₆Aレダクターゼ阻害物質の精製方法

発明の背景

安全で有効な医薬を製造するための重要な基準の一つは、高純度生成物を得ることである。ロバスタチン、シンバスタチン及びアラバスタチンのようなHMG-C₆Aレダクターゼ阻害物質は最近紹介された新しい種類のコレステロール降下剤であり、血漿コレステロール濃度を有效地に低下させるが長期間投与を必要とする。従って、HMG-C₆Aレダクターゼ阻害物質を可能な最高純度で投与できるようになることが特に重要である。

標準的な有機分子の精製方法は、何回もの再結晶化ステップを含み、多量の有機溶媒を使用する。再利用可能な溶媒による1回だけの結晶化を用いて、純度99.5%以上の生成物を得ることができ、しかも量産に適応可能であるような精製方法が切実に要望されている。

化合物純度の分析定量には高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)が普遍的に使用されている。大規模な工業溶法調製物用HPLC(分散HPLC)は、タンパク質の分離及び精製のためには使用されてきたが、HMG-C₆Aレダクターゼ阻害物質のような比較的小さい分子の大規模

精製には使用されていなかったと考えられる。

発明の詳細な説明

本発明は、純度99.5%以上の製品を得るために高圧液体クロマトグラフィーによるHMG-C₆Aレダクターゼ阻害物質の精製方法に関する。本発明のHMG-C₆Aレダクターゼ阻害物質はロバスタチン、シンバスタチン、アラバスタチン、フルバスタチン及びメバスタチンを包含するがこれらの物質に限定はされない。本発明のHPLC法は、99.5%以上の純度を得るために再結晶化が不要であり、通常は結晶化だけを用いるという有効な利点を有する。更に、本発明のHPLC法は、唯一種類の有機溶媒によって行なうことができるので、溶媒選択の必要性も低めて少ない。

本発明の方法では順相HPLCまたは逆相HPLCのいずれを使用することも可能である。ロバスタチン及びシンバスタチンのようなテトラヒドロビラノン環を有するHMG-C₆Aレダクターゼ阻害物質の場合、逆相法が好ましい。カラム充填材は、アンコーテッドシリカ、コーチッドシリカまたは多孔質銀鉱炭から成り得る。本文で使用されたコーティングなる用語は、結合基の物理的結合及

び化学的結合の双方を包含する。

約85%以上の純度を有する粗HMG-C₆Aレダクターゼ阻害物質を有機溶媒または有機溶媒と水との混合液に溶解する。有機または無機の塩によって混合物をpH2~9に緩衝してもよい。緩衝剤の例として、トリスーアセテートまたは酢酸/アンモニアを挙げることができるが、使用できる緩衝剤はこれらの例に限定されない。得られた溶液をHPLCカラムに導入する。カラム充填材は盤形でもよく不齊形でもよい。充填材の直徑は約1μm~約100μmの範囲でよい。好ましくは、充填材が不齊形のオクタデシルシランから成り、充填材の直徑が約3μm~約30μmである。

カラム充填材としては、シリカ、オクチルシラン、ジメチルシラン、オクタデシルシラン、シアノーシランまたはポリスチレンジビニルベンゼン共重合体をオリガノシリル固定相と共に使用し得るが、これらの例に限定はされない。

カラム直徑は5cm~80cmの範囲でよい。常用のカラム長さは約25cmである。必要に応じてカラムの長さは延長し得る。カラムを延長するためには、追加のカラム

を直列に結合するとよい。

通常は、以下の手順でコーテッドシリカまたはアンコートeddシリカをカラムに充填する。充填材をエタノール中でスラリー化する。次いでスラリーをカラムに導し、

Dynamic Axial Compression (D.A.C[®]) を用いて 55 パールで圧縮する。この手順は米国特許第 3,996,609 号及びフランス特許第 73-07278 号に記載されている。またはカラムを径方向に圧縮する。エタノールは移動相と共に排出される。充填後に、分画を逐段的に採取し、標準分析法によってこれらの分画を定量することによってカラムを試験する。

溶出剤としては、有機溶媒を用いるか、または、有機溶媒と水とを含み更に pH 2 ~ pH 9 の緩衝剤を含む溶液を用いる。溶出剤は一般には、溶解用溶媒と同じ種類の溶媒または溶媒混合物であるが、必要な場合には異なる組成の溶出剤を使用し得る。好ましくは溶出剤が溶解用溶媒と同じ種類の有機溶媒とその水性混合物とを含む。所望の場合、HMG-C₀A レダクターゼ阻害物質をカラムからより高速で導出させるために移動相の勾配溶出を用いてもよい。クロマトグラフィー処理の温度として、使用溶媒に適した

鉱炭素も充填すみカラムの形態で市販されている商品である。

溶解用溶媒または溶出剤として使用される有機溶媒は、アセトニトリル、メタノール、エタノール、アセトン、テトラヒドロフラン、イソアプロパノール、酢酸エチル、メチレンクロリド、クロロホルムまたはその混合物から選択される。有機溶媒/水混合物中の有機溶媒の割合は、約 10 % ~ 約 90 % の範囲でよく、好ましくは 65 % ~ 75 % の範囲である。

本発明の目的は更に、純度 99.5 % 以上を有する精製形態の HMG-C₀A レダクターゼ阻害物質またはそれらの塩を提供することである。純度 99.5 % 以上のロバスタチン、シンバスタチン及びアラバスタチンは本発明の目的の 1 つである。更に、純度 99.5 % 以上の HMG-C₀A レダクターゼ阻害物質またはその塩、特に純度 99.5 % 以上のロバスタチン、シンバスタチン及びアラバスタチンを含有する医薬組成物も本発明に包含される。

必要な場合、実施例 6 で後述するように、精製した HMG-C₀A レダクターゼ阻害物質を水性メタノールに溶解し、次いでそこから品出されることによって溶媒、特にア

温度を用いることができ、好ましくは約 15 度 ~ 約 60 度の範囲の温度を用いる。好ましい実施態様では、分離工程を通じて等温条件を維持する。HMG-C₀A レダクターゼ阻害物質の検出は、分光学的手段によるが、蛍光もしくは屈折率を用いる別の物理的手段によってもよい。紫外線吸収または屈折率を用いる手段が好ましい。該当する HMG-C₀A レダクターゼ阻害物質のピークを収集した後で、溶媒の一部分を除去し、水溶液を添加して、HMG-C₀A レダクターゼ阻害物質を品出させる。一般には、溶媒混合物の約 1 / 3 を除去し、水を使用して HMG-C₀A レダクターゼ阻害物質を品出させる。または、溶媒混合物の約 2 / 3 を除去することによって HMG-C₀A レダクターゼ阻害物質を品出させる。品出した阻害物質を次に済過し、乾燥すると、純度 99.5 % 以上の生成物が純度約 90 % で得られる。標準品に対する生成物の純度を HPLC によって決定する。収率は重量によって決定する。

文献に記載された当業者に周知の手順のいずれかによつて粗 HMG-C₀A レダクターゼ阻害物質を調製する。充填材として使用されるアンコートeddまたはコーテッドシリカは市販商品である。充填材として使用される多孔質層

セトニトリルの残留量を減少させ得る。

医薬として許容される本発明化合物の塩は、ナトリウム、カリウム、アルミニウム、カルシウム、リチウム、マグネシウム、亜鉛のようなカチオンから形成された塩、アンモニア、エチレンジアミン、N-メチルグルカミン、リシン、アルギニン、オルニチン、コリン、N,N'-ジベンジルエチレンジアミン、クロロアロカイン、ジエタノールアミン、アロカイン、N-ベンジルフェニチルアミン、ジエチルアミン、ビペラジン、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン及びテトラメチルアンモニウムヒドロキシドのような塩基から形成された塩を包含する。

本発明の精製化合物はまた、コレステロールの生合成の酵素経路を阻害するような別のコレステロール降下剤と混用投与してもよい。このようなコレステロール降下剤の非限定例としては、スクアレンシンセターゼ阻害物質、HMG-C₀A シンセターゼ阻害物質及びスクアレンエボキシダーゼ阻害物質がある。このような阻害物質の代表例は、米国特許第 5,053,425 号、5,055,487 号及び第 5,026,554 号に記載されたスクアレンシンセターゼ阻害物質である。投与可能な別のコレステロール降下剤

の例としては、ナイアシン、アロブコール、フィブリックアシッド (fibrylic acid)、クロフィブレート及びジエンフィブロジル (gemfibrozil) がある。成人の適正な日用量は夫々、ナイアシン 2~8 g/m、アロブコール 1 000 mg 以下、クロフィブレート 2 g/m 以下及びジエンフィブロジル 800~1 500 mg である。

本発明の化合物は更に、粗計量と結合して胃腸管に再吸収されない形態になり得る医薬として許容される無毒カチオン性ポリマーと同時に使用される。このようなポリマーの例は、コレステラミン、コレステボール及びポリメチル-(3-トリメチルアミノアロビル)イミノトリメチレンジハライドである。本発明化合物とこれらのポリマーとの相対量は 1:1 00~1:15,000 である。

実験例1

4.6 g の粗ロバスタチンを 200 ml の 70:30 アセトニトリル/水に溶解し、これを、 $10 \mu\text{m}$ の不齊形オクタデシルシランから成る HPLC 充填材を充填した直徑 5 cm、長さ 25 cm のステンレススチールカラム (RG 1010-C18, The PQ Corporation, Conshohocken, PA) に注入した。溶出

nm の UV 吸収によって検出した。ロバスタチン分画は $R' = 2.0 \sim 3.0$ で溶出した。ロバスタチンビークを収集し、 $\leq 40^\circ\text{C}$ で減圧蒸留することによって 1/3 量を除去した。水を添加してアセトニトリル濃度を 25~30% にした。ロバスタチンを済過し、 $\leq 40^\circ\text{C}$ で真空乾燥した。純度 99.7% のロバスタチンを総収率 90% で回収した。

実験例2

4.6 g の粗ロバスタチンを、200 ml の 70:30 アセトニトリル/0.02 M のトリスーアセテート (pH 7.5) で緩衝した水に溶解した。溶液を、 $10 \mu\text{m}$ の不齊形オクタデシルシランから成る HPLC 充填材を充填した直徑 5 cm、長さ 25 cm のカラム (RG 1010-C18, The PQ Corporation, Conshohocken, PA) に充填した。溶出剤は 70:30 アセトニトリル/水であり、流速は約 150 ml/min であった。254 nm の UV 検出を使用し、ロバスタチン分画を 265 ml の量で収集した。ロバスタチンビークは $K' = 2.0 \sim 3.0$ で溶出した。溶媒の 1/3 を除去することによって、得られた溶液を濃縮すると、ロバスタチンが溶出した。済過及び乾燥によって純度 99.7% のロバスタチンを総収率 91% で回収した。

剤は 70:30 アセトニトリル/水であり、流速は約 150 ml/min であった。254 nm の UV 検出を使用し、ロバスタチン分画を 260 ml の量で収集した。ロバスタチン分画は $K' = 2.0 \sim 3.0$ で溶出した。米国商務局第 22 版 (P-1565: 1990) に記載のように容量係数 K' は保持時間に関連する。溶媒の 1/3 を除去することによって、得られた溶液を濃縮し、約 25~30% のアセトニトリル濃度が得られるまで水を添加してロバスタチンを溶出させた。済過及び乾燥によって純度 99.7% のロバスタチン生成物を回収した。純度 99.7% のロバスタチンを総収率 90% で回収した。

実験例3

濃度 2.3 g/100 ml のロバスタチンを 70% アセトニトリル/30% の 0.02 M トリスーアセテート (pH 7.4) に溶解した。 $10 \mu\text{m}$ の不齊形オクタデシルシランを充填した直徑 5 cm、長さ 25 cm のステンレススチールカラム (RG 1010-C18, The PQ Corporation, Conshohocken, PA) に充填した。溶出剤は 70% アセトニトリル/30% 水から成り、流速は約 150 ml/min であった。254

nm の UV 吸収によって検出した。ロバスタチン分画は $R' = 2.0 \sim 3.0$ で溶出した。ロバスタチンビークを収集し、 $\leq 40^\circ\text{C}$ で減圧蒸留することによって 1/3 量を除去した。水を添加してアセトニトリル濃度を 25~30% にした。ロバスタチンを済過し、 $\leq 40^\circ\text{C}$ で真空乾燥した。純度 99.7% のロバスタチンを総収率 91% で回収した。

実験例4

4.6 g の粗ロバスタチンを、200 ml の 70:30 アセトニトリル/0.02 M のトリスーアセテート (pH 7.5) で緩衝した水に溶解した。溶液を、 $10 \mu\text{m}$ の不齊形オクタデシルシランから成る HPLC 充填材を充填した直徑 5 cm、長さ 25 cm のカラム (RG 1010-C18, The PQ Corporation, Conshohocken, PA) に充填した。溶出剤は 70:30 アセトニトリル/水であり、流速は約 150 ml/min であった。254 nm の UV 検出を使用し、ロバスタチン分画を 265 ml の量で収集した。ロバスタチンビークは $K' = 2.0 \sim 3.0$ で溶出した。溶媒の 2/3 を除去することによって、得られた溶液を濃縮すると、ロバスタチンが溶出した。済過及び乾燥によって純度 99.7% のロバスタチン生成物を回収した。純度 99.7% のロバスタチンを総収率 91% で回収した。

実験例5

4.5 g / 100 ml の濃度のロバスタチンを、70% アセトニトリル / 30% の 0.02 M トリスアセテート (pH 7.2) 混合物に溶解した。40°C の恒温を、10 ~ 20 μm の不齊型オクタデシルシリランから成る HPLC 充填材を充填した直径 5 cm、長さ 25 cm のステンレススチールカラム (RG 1020-C18, The PQ Corporation, Conshohocken, PA) に注入した。溶出剤は 70 : 30 アセトニトリル / 水であり、流速は約 150 ml / 分であった。媒体とカラムヒートを 40°C の等温に维持した。254 nm の UV 検出器を使用し、ロバスタチン分画を 500 ml の量で収集した。ロバスタチン分画は K' = 2.0 ~ 3.0 で溶出した。溶媒の 2 / 3 を除去することによって、得られた溶液を濃縮することによってロバスタチンを晶出させた。过滤及び乾燥によってロバスタチンを回収した。純度 99.8% w/w のロバスタチンを採取率 90% で回収した。

第6页

実験例5に記載の手順で調製した6.0 gの特製ロバスタチンを、60℃に維持した100 mlの95%メタノール／5%水に溶解した。60℃の浴槽に等量の6.5%水／

35%メタノールを添加することによって晶出させた。得られた結晶質混合物を1/2量まで濃縮した。沸騰及び乾燥によってロバスクチンを回収した。5.98gのロバスクチンを回収した。

要旨附 7

粗ロバスタチンの代わりに粗シンバスタチンを使用し、実験例5に記載の手順と同様の手順を用いてシンバスタチンを純度99.5%以上の結晶質形に精製し得る。

寒流風

粗ロバスタチンの代わりに粗アラバスタチンを使用し、実験例5に記載の手順と同様の手順を用いてアラバスタチンを純度99.5%以上の結晶質形に精製し得る。